

بررسی مولکولی سویه های مولد کیست هیداتیک گوسفندی در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از پلی مورفیسم قطعه طولی محدود

دکتر حسین یوسفی*، دکتر مرتضی هاشم زاده**، زهرا علی یاری***، عفت فرخی†، نزهت زبردست***
*دانشیار گروه انگل شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، **دانشیار گروه بیوشیمی و ژنتیک و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ***کارشناسی ارشد انگل شناسی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۱۵/۱۲/۱۵ تاریخ تأیید: ۱۶/۲/۱۵

چکیده:

زمینه و هدف: کیست هیداتیک مرحله لاروی کرم اکیونوکوکوس گرانولوزوس از رده سستودهاست که در بدن انسان و تعدادی از پستانداران ایجاد بیماری اکیونوکوزیس می نماید. استرین های متفاوتی تاکنون از این انگل در دنیا گزارش شده که این تنوع استرینها ممکن است بر اپیدمیولوژی و بیماریزایی کیست هیداتیک اثر بگذارد. هدف از این مطالعه بررسی استرین های ایزوله های گوسفندی در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از روش PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) بود.

روش بررسی: بدین منظور تعداد ۳۰ نمونه کیست هیداتیک با منشاء گوسفندی در سال ۱۳۸۳ از کشتارگاههای سراسر استان جمع آوری گردید. پس از استخراج DNA ژنومی پروتواسکولکسهای کیست هیداتیک با استفاده از روش فنل کلوروفرم، ناحیه ¹rDNA-ITS (ribosomal DNA-Internal Transcribed Spacer1) هر کدام از ایزوله ها با استفاده از پرایمرهای BDI (Forward) و s (Reverse) تکثیر گردید. سپس محصولات بدست آمده توسط چهار آنزیم TaqI، HpaII، RsaI، AluI و هضم گردید و محصولات PCR و هضم آنزیمی با استفاده از ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز و توسط روش نیرتات نقره رنگ آمیزی شد.

یافته ها: طبق نتایج بدست آمده اندازه قطعه ¹rDNA-ITS تکثیر یافته، ۱۰۰۰bp بود. پس از هضم آنزیمی با آنزیم ALuI، قطعاتی با اندازه ۸۰۰bp و ۲۰۰bp با آنزیم RsaI قطعاتی با اندازه ۶۵۵bp و ۳۴۵ bp و آنزیم HpaII قطعات با اندازه ۷۰۰bp و ۳۰۰bp بدست آمد. با استفاده از آنزیم TaqI تغییری در اندازه حاصل نشد و قطعه با اندازه ۱۰۰۰ bp در الکتروفورز مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان دادند که سویه گوسفندی کیست هیداتیک غالب در استان چهارمحال و بختیاری ژنوتیپ G₁ است که مطابق با سویه شایع ایران و جهان می باشد.

واژه های کلیدی: آنزیم های محدود الاثر، کیست هیداتیک، پروتواسکولکس، تشخیص مولکولی، سویه.

مقدمه:

بسیاری از مناطق دنیا شایع است. این بیماری در اغلب نقاط ایران بخصوص نواحی روستایی که معمولاً در آنجا مواد زائد کشتار دامها به صورت غیر بهداشتی و ناصحیح دفع می شود وجود دارد (۱-۳).

بیماری هیداتیدوزیس ناشی از اکیونوکوکوس گرانولوزوس (*Echinococcus granulosus*)، یکی از مهمترین بیماریهای مشترک انسان و دام است که در

نویسنده مسئول: شهرکرد-رحمتیه- دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۳۵۶۵۴، E-mail:

H_yousofi@yahoo.com

جمع آوری نمونه ها: تعداد ۳۰ مورد کیست هیداتیک با منشاء گوسفندی در سال ۱۳۸۳ از کشتارگاههای سراسر استان جمع آوری و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات

سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد منتقل شد. سپس محتویات هر کیست با سرنگ استریل آسپیره گردید و مایع آسپیره شده از نظر وجود پروتواسکولکس بررسی گردید. چنانچه پروتواسکولکس در مایع وجود داشت چند بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد و در نهایت پروتواسکولکس ها در الکل ۷۵ درصد نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی: ابتدا پروتواسکولکس ها را سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده و سپس DNA ژنومی نمونه ها با استفاده از روش هضم انگلی در SDS و پروتیناز K و استخراج با روش فنل کلروفرم و رسوب اتانل استخراج گردید (۱۸). به رسوب حاصل مقدار ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردیده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. **انجام PCR:** توالی به طول ۱۰۰۰ bp از قطعه 1 ITS با استفاده از BDI:5'-GTCCTAACAAGGTTTCCG-TA-3' (Forward) (Reverse) 4s:5'-TCTAGCGTTCCGAA(GA)TGTCGATG-3' (۱۵) ساخت شرکت سیناژن و به کمک ترموسایکلر (Techne) تکثیر شد.

قطعه 1 ITS شامل مقداری از ژن 18s و قسمت اعظم ژن 5/8s مربوط به ژنهای rDNA ریبوزومی انگل است. مخلوط PCR برای هر نمونه پس از بهینه کردن غلظت های اجزاء آن به میزان ۲۵ میکرولیتر حاوی TaqDNA به میزان ۱ واحد، $MgCl_2$ به میزان ۳ میکرولیتر، پرایمرهای BDI و 4s به میزان ۱ میکرولیتر، DNA به میزان ۱ میکرولیتر، بافر PCR $10 \times$ به میزان ۲/۵ میکرولیتر و mix dNTP به میزان یک میکرولیتر تهیه گردید. پس از تهیه مخلوط PCR با تنظیم دستگاه ترموسایکلر روی برنامه چرخه حرارتی زیر عمل تکثیر DNA انجام شد:

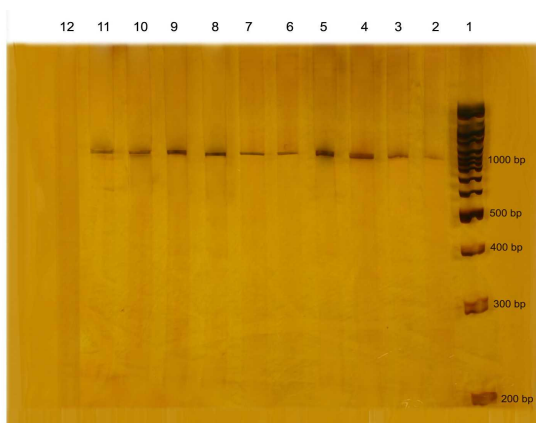
کرم بالغ این انگل در ایران از سگ، شغال و گرگ جدا شده است (۶-۴). نتایج بررسی های متعدد در کشور نیز نشان داده که کیست هیداتیک عموماً در دامهای اهلی مانند گوسفند، گاو و شتر یافت (۷،۱) و موارد انسانی نیز بطور مداوم از ساکنین استانهای مختلف کشور گزارش گردیده است (۳).

استان چهارمحال و بختیاری به خاطر شرایط اقلیمی ویژه، وجود شغل دامپروری در سطح گسترده و نگهداری سگ توسط دامداران و روستائیان جزء منطقه پر خطر از نظر ابتلاء به کیست هیداتیک می باشد. شیوع بالای کیست هیداتیک در مقایسه با دیگر نقاط کشور و همچنین مناطق مختلف دنیا در شهرستان لردگان نشان داده شده است (۸).

معمولاً در مناطقی که بیماری اندمیک است، از نظر بیولوژی، تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی در اکتینوکوکوس گرانولوزوس وجود دارد (۹،۱۰). مطالعات متعدد ثابت نموده که در این گونه مناطق، اکتینوکوکوس به صورت کمپلکسی از استرین های مختلف وجود دارد (۱۱،۱۲) که این تنوع ممکن است بر روی اپیدمیولوژی و بیمارزائی کیست هیداتیک اثر گذارد (۱۳). علاوه بر این دلایلی وجود دارد که برخی استرین ها برای انسان نسبت به سایر استرین ها، بیماری زایی بیشتری دارند (۱۱). تاکنون ۹ ژنوتیپ مجزا (G_1-G_9) از این انگل با استفاده از روشهای مولکولی شناسائی شده است (۱۴،۱۵). این استرین ها از چندین کشور از جمله استرالیا، چین و لهستان (۱۵،۱۶،۱۷) گزارش شده اند. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در مورد شناسایی استرین های موجود در استان چهارمحال و بختیاری ایران انجام نشده است، این بررسی با هدف شناسایی استرین های گوسفندی این منطقه انجام شد.

روش بررسی:

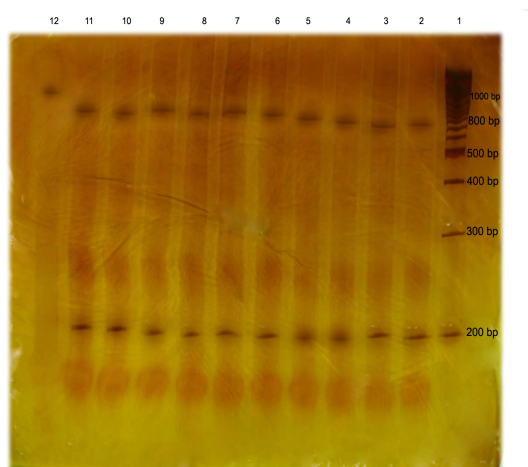
محصولات PCR ناحیه^۱ rDNA-ITS مربوط به ۳۰ مورد کیست هیداتیک با منشاء گوسفندی نشان داد که طول این قطعه در تمام نمونه ها ۱۰۰۰ bp بود (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: محصولات PCR نمونه‌های پروتواسکولکس کیست هیداتیک گوسفندی بر روی ژل پلی آکرلامید ۴٪.

–ستون‌های شماره ۱۱–۲ نمونه مورد بررسی، ستون شماره ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، ستون شماره ۱۲: کنترل منفی.

الگوی RFLP محصول PCR ناحیه^۱ rDNA-ITS تمام کیست ها پس از هضم آنزیمی در تمام نمونه ها یکسان بود به طوری که با آنزیم برش



یافته ها:

۱- مرحله denaturation ابتدایی، با دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه

۲- مرحله denaturation با دمای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه

۳- مرحله annealing، با دمای ۵۵°C به مدت ۱ دقیقه

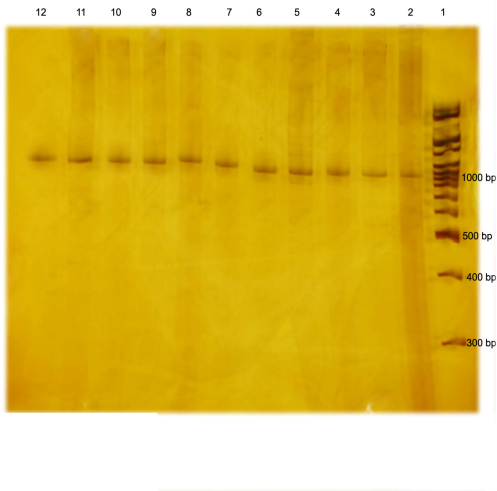
۴- مرحله extension با دمای ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه (مراحل ۲-۴، ۳۰ سیکل تکرار شدند).

۵- مرحله extension انتهایی با دمای ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه، سپس محصول PCR بدست آمده بروی ژل پلی اکریل آماید الکتروفورز گردیده و توسط روش نیرتات نقره رنگ آمیزی شد.

هضم اندونوکلازای:

از چهار آنزیم TaqI و HpaII، RsaI، AluI (شرکت سازنده) که به ترتیب توالی های AG/CT، GT/AC، C/CGG، T/CGA را شناسایی می کند برای هضم آنزیمی محصول PCR استفاده گردید (۲۰، ۱۹). هضم آنزیمی در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام می شد که از این حجم ۲ میکرولیتر مربوط به بافر مناسب آنزیم، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۱ میکرولیتر (۱۰ واحد) آنزیم مربوطه بوده که با آب مقطر استریل حجم به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس محتوی واکنش آنزیمی در دمای خاص (پیشنهاد کارخانه سازنده آنزیم) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. این دما در مورد آنزیم های AluI، HpaII، RsaI ۳۷ درجه سانتیگراد و در مورد آنزیم TaqI ۶۵ درجه سانتیگراد بود. پس از طی زمان انکوباسیون پیشنهادی محصول فوق بر روی ژل پلی اکریل آماید ۴۰ درصد الکتروفورز شده و با رنگ آمیزی نیرتات نقره باندهای حاصل ظهور و بررسی گردیدند.

تصویر شماره ۴: الگوی به دست آمده حاصل از هضم آندوژنیک آنژوکلنازی محصول PCR ۱۰۰۰ bp از ناحیه ^۱rDNA-ITS کیست هیداتیک گوسفندی با آنزیم *RsaI* بر روی ژل آکریل آمید ۴۰٪. ستون‌های شماره ۱۰-۱۱ نمونه مورد بررسی، ستون شماره ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp، ستون شماره ۱۲: کنترل مثبت.



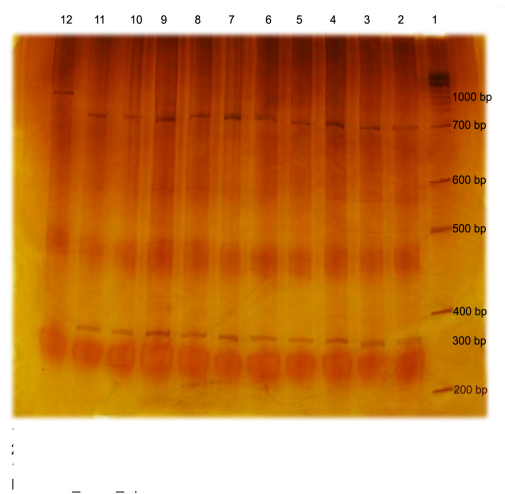
تصویر شماره ۵: الگوی به دست آمده حاصل از هضم آندوژنیک آنژوکلنازی محصول PCR ۱۰۰۰ bp از ناحیه ^۱rDNA-ITS کیست هیداتیک گوسفندی با آنزیم *TaqI* بر روی ژل آکریل آمید ۴۰٪. ستون‌های شماره ۱۱-۱۲ نمونه مورد بررسی، ستون شماره ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp، ستون شماره ۱۲: کنترل مثبت.

با آنزیم *RsaI* برش دهنده قطعات حاصل با اندازه ۶۵۵ bp و ۳۴۵ bp (تصویر شماره ۴) و هضم آنزیمی با آنزیم *TaqI* برش دهنده هیچ برشی بر روی ژنوم پروتواسکولکس ایجاد نموده و قطعه حاصل اندازه ۱۰۰۰ bp داشت (تصویر شماره ۵).

بحث:

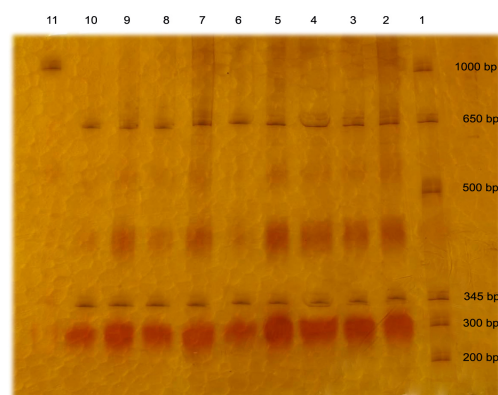
در این مطالعه با استفاده از روش PCR، ناحیه ^۱rDNA-ITS پروتواسکولکس‌های جدا شده از کیست هیداتیک گوسفندی تکثیر داده شد و پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی طول قطعه تکثیر شده در تمام نمونه ها یکسان و برابر ۱۰۰۰ bp بود که با یافته های Bowles و همکاران در سالهای ۱۹۹۳ و ۱۹۹۴ مشابه است. این محققین اندازه قطعه ^۱rDNA-ITS تکثیر یافته با روش PCR برای

تصویر شماره ۶: الگوی به دست آمده حاصل از هضم آندوژنیک آنژوکلنازی محصول PCR ۱۰۰۰ bp از ناحیه ^۱rDNA-ITS کیست هیداتیک گوسفندی با آنزیم *AluI* بر روی ژل آکریل آمید ۴۰٪. ستون‌های شماره ۱۱-۱۲ نمونه مورد بررسی، ستون شماره ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp، ستون شماره ۱۲: کنترل مثبت.



تصویر شماره ۷: الگوی به دست آمده حاصل از هضم آندوژنیک آنژوکلنازی محصول PCR ۱۰۰۰ bp از ناحیه ^۱rDNA-ITS کیست هیداتیک گوسفندی با آنزیم *HpaII* بر روی ژل آکریل آمید ۴۰٪. ستون‌های شماره ۱۱-۱۲ نمونه مورد بررسی، ستون شماره ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ bp، ستون شماره ۱۲: کنترل مثبت.

دهنده *AluI* و قطعات حاصل با اندازه ۸۰۰ bp و ۲۰۰ bp (تصویر شماره ۶)، با آنزیم *HpaII* برش دهنده قطعات با اندازه ۷۰۰ bp و ۳۰۰ bp (تصویر شماره ۷)،



شد که با الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفندی با ژنوتیپ G₁ یکسان می باشد (۲۵،۲۴،۲۳).

پس از هضم آنزیمی با آنزیم برش دهنده TaqI در تمام نمونه‌ها این آنزیم هیچ برشی بر روی ژنوم پروتواسکولکس ایجاد ننموده که این نتیجه با الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفندی با ژنوتیپ G₁ یکسان می باشد (۲۵،۲۴،۲۳).

با توجه به الگوی الکتروفورزی و نتایج بدست آمده چنین به نظر می رسد که سویه غالب E.granulosus در گوسفندان استان چهارمحال و بختیاری همانند سویه غالب در دنیا و ایران ژنوتیپ G₁ باشد. لذا توصیه می گردد در مطالعات بعدی استرین مربوط به نمونه‌های انسانی کیست هیداتیک تعیین گردد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از تمامی کسانی که ما را در این طرح یاری نمودند قدردانی می گردد. هزینه انجام این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تامین گردیده است.

ایزوله‌های گوسفندی با ژنوتیپ G₁ را ۰/۹kb و ۱ kb گزارش نمودند (۲۲،۲۱،۱۴). همچنین احمدی و همکاران (۲۳) و شهنازی و همکاران (۲۴) نتایج

مشابهی در مورد PCR ایزوله‌های گوسفندی در ایران بدست آوردند.

الگوی RFLP محصول PCR ناحیه rDNA-ITS₁ تمام کیست‌های گوسفندی پس از هضم آنزیمی با آنزیم برش دهنده AluI در تمام نمونه‌ها یکسان بوده و قطعات حاصل با اندازه ۸۰۰ bp و ۲۰۰ bp حاصل شد که با الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفندی با ژنوتیپ G₁ یکسان می باشد (۱۷،۱).

الگوی RFLP محصول PCR ناحیه rDNA-ITS₁ تمام کیست‌های گوسفندی پس از هضم آنزیمی با آنزیم برش دهنده RsaI در تمام نمونه‌ها یکسان بوده و قطعات با اندازه ۶۵۵ bp و ۳۴۵ bp حاصل شد که با الگوی PCR-RFLP ایزوله‌های گوسفندی با ژنوتیپ G₁ یکسان می باشد (۱۶،۱). متعاقب هضم آنزیمی با آنزیم برش دهنده HpaII در تمام نمونه‌ها قطعاتی با اندازه ۷۰۰ bp و ۳۰۰ bp حاصل

منابع:

1. Harandi MF, Hobbs RP, Adams PJ, Mobedi I, Morgan-Ryan UM, Thompson RC. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran. *Parasitology*. 2002 Oct; 125(pt4): 367-73.
2. Dalimi A, Motamedi G, Hossini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, et al. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet Parasitol*. 2002 Apr; 105(2): 161-71.
3. Bastani B, Dehdashti F. Hepatic hydatid disease in Iran, with review of the literature. *Mount Sinai J Medicine*. 1995; 62: 62-9.
4. Maleky F, Moradkhan M. Echinococcosis in the stray dogs of Tehran Iran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000 Jun; 94(4): 329-31.
5. Eslami A, Hosseini SH. *Echinococcus granulosus* infection of farm dogs of Iran. *Parasitol Res*. 1998; 84(3): 205-7.
6. Mehrabani D, Oryan A, Sadjjadi SM. Prevalence of *Echinococcus granulosus* infection in stray dogs and herbivores in Shiraz, Iran. *Vet Parasitol*. 1999 Oct; 86(3): 217-20.
7. Ahmadi NA. Hydatidosis in camels (*Camelus dromedarius*) and their potential role

in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Iran. J Helminthol. 2005 Jun; 79(2): 119-25.

8. Yousofi Darani H, Avijgan M, Karimi K, Manouchehri K, Masood J. Seroepidemiology of hydatid cyst in Chaharmahal & Bakhtiari province, Iran. Iranian J Public Health. 2003; 32(2): 31-3.

9. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol. 1992 Sep; 54(2): 156-73.

10. McManus DP, Rishi AK. Genetic heterogeneity within *Echinococcus granulosus*, isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes. Parasitol. 1989; 99: 17-29.

11. McManus DP, Smyth JD. Hydatidosis: changing concepts in epidemiology and speciation. Parasitol Today. 1986 Jun; 2 (6): 163-8.

12. Bowles J, McManus DP. Molecular variation in *Echinococcus*. Acta Trop. 1993; 53: 291-305.

13. Thompson RCA. Biology and systematic of echinococcus. In: Thompson RCA. The biology of echinococcus and hydatid disease. London: Allen and Unwin. 1986; p: 5-43.

14. Bowles J, Blair D, McManus DP. A molecular phylogeny of the genus echinococcus. Parasitology. 1995; 110: 317-28.

15. Lymbery AJ, Thompson RCA, Hobbs RP. Genetic diversity and genetic differentiation in *Echinococcus granulosus* from domestic and sylvatic hosts on the mainland of Australia. Parasitology. 1990; 101: 283-9.

16. Scott JC, Stafaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland, identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. Parasitology. 1997; 114: 37-43.

17. Zhang LH, Chai JJ, Jiao W, Osman Y, McManus DP. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north western China. Parasitology. 1998; 116: 29-33.

18. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press; 1982. p: 121-32.

19. Bowles J, McManus DP. Rapid discrimination of *Echinococcus species* and using a PCR-based RFLP method. Mol Biochem Parasitol. 1993; 57: 231-9.

20. Hop M, Bowles J, McManus DP. Reconsideration of the *Echinococcus granulosus* strain in Australia following RFLP analysis of cystic material. Int J Parasitol. 1997 Jul; 21(4): 471-5.

21. Bowles J, Blair D, McManus DP. Genetic variants within the Genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA Sequencing. Mol Biochem Parasitol. 1992; 165-73.

22. Bowles J, McManus DP. DNDN dehydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. Int J Parasitol. 1993; 23: 969-72.

23. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genet Evol. 2006 Mar; 6(2): 85-90.

۲۴. شهنازی مجتبی. بررسی تنوع سویه های اکینوкокوس گرانولوزوس به روش PCR-RFLP در استان اصفهان، رساله دکترای تخصصی انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه اصفهان. ۱۳۸۲.

25. Rosenzvit MC, Zhang LH, Kamenetzky L, Canova SG. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. Parasitology. 1999; 118: 523-30.

